



特 許 願 (イ)

昭和47年3月23日

特許庁長官 殿

1. 発明の名称

好気微生物の培養法

2. 発明者

大阪府吹田市藤白台4-13-2
チバタ 伊郎
千 田 一 郎

3. 特許出願人

郵便番号 541
大阪府大阪市東区道修町3丁目21番地
(295) 田辺製薬株式会社
代表者 平 林 忠 雄

4. 代理人

郵便番号 532
大阪府大阪市東淀川区加島町962番地
田辺製薬株式会社
(6461) 弁理士 中 嶋 正 二

47 029202 審査

① 日本国特許庁

公開特許公報

① 特開昭 48-96782

④ 公開日 昭48.(1973) 12 10

② 特願昭 47-29302

② 出願日 昭47.(1972) 3.23

審査請求 有 (全6頁)

庁内整理番号

⑤ 日本分類

6712 49

36(2)B02

明 細 書

発明の名称

好気微生物の培養法

特許請求の範囲

好気微生物を液体培養するに際し、培地中に酸素溶解能が高くかつ培地と相互に溶解しない不活性有機液体を一種又は二種以上添加することを特徴とする好気微生物の培養法。

発明の詳細な説明

本発明は好気微生物の改良培養法に関する。
一般に好気微生物を好氣的条件下液体培養するにあたっては、酸素の水に対する溶解度が著しく低いこと、培養液中の溶存酸素の不足が菌体増殖速度または発酵生産物の生成量、生成速度を低下させる大きな原因となっている。従って培地中の溶存酸素の不足を補い工業的に好気培養を行なうためには、常に気相中より培養液中への酸素の溶解速度を増加せしめることが重要な要件である。

このために従来より例えば発酵容器の形状を変えたり、振とうあるいはかくはん速度を高めたり、通気量の増加もしくは通気ガス中の酸素濃度を大気中のそれより高めたりする等の方法が工夫されてきた。

しかしながら諸種の工夫にもかかわらず、これら従来方法の酸素供給能には限界がありその目的を十分に達する迄には至っていない。

また最近、炭化水素資化活性菌を炭化水素を主な栄養源とする培地に培養してアミノ酸、酵素及至補酵素等種々の物質を蓄積せしめる方法も開発されてきているが、この場合は通常の通気かくはん培養では必要な溶存酸素濃度を維持することが難しい。従ってこの方面からも培地中への酸素供給量を適格に増加せしめる方法が強く望まれている。

本発明者らは好気微生物を効率よく培養する方法に関し鋭意研究を重ねた結果、酸素溶解能が高くかつ培地と相互に溶解しない不活性有機液体（以下単に不活性有機液体と略称する）を培

地に添加することにより気相より培養液中への酸素移動量を著るしく増大せしめ、ひいては菌体の生育速度及び生産物の蓄積速度、蓄積量を著るしく向上させうることを見出すに至った。本発明はかかる知見にもとづいて完成されたものであり、而してその目的とする所は、好気微生物の発酵時間を短縮し、併せて菌体もしくはその発酵生産物の生成量を増大せしめる改良方法を提供するにある。

本発明によれば、好気微生物は一種又は二種以上の不活性有機液体を添加した液体培地中で培養することにより工業的に有利に培養することが出来る。

本発明に於いて使用しうる不活性有機液体としては液状フルオロカーボン及び低粘度即ち粘度15CS（センチ・ストークス）以下のシリコンオイル等を挙げることができる。液状フルオロカーボンとしてはとりわけ炭素数5～15の範囲内のものを用いるのが好ましく、これに属するフルオロカーボンとしては具体的には例え

例えば沸点146℃、比重0.85、25℃での酸素溶解能100ml/100ml liq. 以下、分子量316を有するダウ・コーニング・コーポレーション製DC-200-1CS（商品名）等を挙げることができる。通常好気培養時消泡剤として用いるシリコンオイルは粘度3,000～5,000CSの範囲のものであるが、かかる高粘度のものは、本発明の目的には適さない。これら本発明で使用する不活性有機液体は液体培地に対し通常5～80V/V%、とりわけ8～40V/V%程度添加するのが望ましい。培地に対し1～2V/V%程度の添加ではその効果も僅かであり、一般的には添加量の増加と共にその効果も増加する。しかし微生物の要求する酸素量以上に不必要な酸素供給を行なう必要はなく、場合によっては他の酸素移動量を増大せしめる方法、例えば容器の形状、かくはん数、通気量^改を改善する等の方法を併用するのも好ましい。これら不活性有機液体は培地の滅菌後或いは滅菌前のいずれの段階に於いても添加することが

特開 昭48-96782(2)

ば化学式 $C_{12}H_{27}F_{11}$ （沸点174℃、比重1.87、25℃での酸素溶解能39ml/100ml liq.）〔商品名：イソナート・リキットFC-43、インナート・リキットFC-47（スリーエム社製）〕、化学式 $C_8F_{16}O$ （沸点102℃、比重1.77、25℃での酸素溶解能49ml/100ml liq.）〔商品名：インナート・リキットFX-80、インナート・リキットFC-75、インナート・リキットFC-80〕、化学式 C_7F_{14} （沸点115℃、比重1.73、25℃での酸素溶解能42ml/100ml liq.）〔商品名：L-1822〕、化学式 $C_{10}F_{18}$ （沸点142℃、比重1.95、25℃での酸素溶解能45ml/100ml liq.）〔商品名：PP5〕、化学式 $C_{11}F_{20}$ （沸点160℃、比重1.97、25℃での酸素溶解能42ml/100ml liq.）〔商品名：PP9〕で示されるもの等を挙げることが出来る。また低粘度のシリコンオイルとしてはとりわけ粘度0.65～15CSの範囲内のものを用いるのが好ましく、かかるものとしては

でき、後者の場合不活性有機液体は蒸気加圧滅菌乃至ガス滅菌して添加する。

これら不活性有機液体と共に培地に添加する栄養源には何ら制限なく通常の好気的条件下に菌株を培養する際用いられるものをそのままこでも用いることが出来る。例えば使用菌株の要求に従って適宜の炭素源（ブドウ糖、乳糖、麦芽糖、砂糖等の糖類、デンプン、大豆油、デキストリン等の多糖類、ソルビット、マンニット等の糖アルコール類、グリセリン等の多価アルコール類、酢酸、フマル酸、クエン酸等の有機酸等）、窒素源（ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、綿実粕、大豆粉、落下生粉、たん白質加水分解物、無機硝酸塩、有機又は無機アンモニウム塩等）、無機物、或いは特定物質の生産に際して必要とされる先駆物質（プレカーサー）その他の微量成分を添加することが出来る。

本発明で使用する不活性有機液体は、培地に添加される前の不活性有機液体の保有する酸素

のみを利用するものではなく、主として培養期間を通じて気相中より培養液中への酸素移動を助長させるものである。従って培養操作も通常通気かくはん又はしんとう条件下に実施するのが好ましい。しかしながら当該不活性有機液体を培養期間中連続的または間欠的に分離しうる場合には、かかる条件に制限されることなく例えば当該不活性有機液体を別の系で酸素と接触せしめてその酸素溶解量を増加させ、ついで再び培地中にもどし、その高められた溶解酸素を利用する等の培養方法も採用することができる。発酵終了後、培養液を静置すれば不活性有機液体は培養液との比重の差により容易に分離することができ、回収された不活性有機液体は再び本発明の目的に供することができる。

尚、上記の如き本発明方法は広く好気微生物一般に適用しうる。例えばストレプトミセス属、マイクロモノスポラ属などの放線菌、サツカロミセス属などの酵母、アスペルギルス属などのカビおよびプロテウス属、エシエリシア属、セラ

度、発酵完結に要した時間及び反応進行率は下記第1表の如くである。

第 1 表

FC-43添加量 (V/V%)	発 酵 盛 期 (培養hr)	ソルボース最大 生成速度 ($\frac{\text{mol.sorbose}}{\text{ml.hr}}$)	発酵所要時間 (培養hr)	発酵完結時ソ ルボース生成率 (%)
0	8~24	5.8×10^{-5}	27	96
10	6~18	7.2×10^{-5}	20	97
20	5~14	8.9×10^{-5}	15	95
40	5~12	9.6×10^{-5}	12	96

実施例 1

ソルビット 20%、コーンステープリカー 1%、炭酸カルシウム 0.3% の組成よりなる液体培地 500 ml を 1 l 容発酵槽に調整し、フルオロカーボン (インナート・リキット FC-43) 100 ml を添加する。該液を常法に従って蒸気加圧滅菌し、30℃ に冷却した後、アセトバクター・サブオキシダンス (Acetobacter suboxydans) ATCC-621 を接種する。通気量 250 ml/min、かくはん数 5

特開 昭48-96782(3)

チア属、シュウドモナス属、アクロバクター属、コリネバクテリウム属、マイクロツカス属、プレバクテリウム属およびアセトバクター属などの細菌に適用すれば、その発酵時間を著るしく短縮せしめることが出来ると共に、併せてアミノ酸、抗生物質、酵素、補酵素、ビタミン類等その発酵生産物の蓄積量も著明に増加させることができる。

実施例

ソルビット 20%、コーンステープリカー 1%、炭酸カルシウム 0.3% の組成よりなる液体培地 500 ml を 1 l 容発酵槽に調整し、フルオロカーボン (インナート・リキット FC-43) を加える。該液を常法に従って蒸気加圧滅菌後 30℃ に冷却しアセトバクター・サブオキシダンス (ATCC-621) を接種する。通気量 250 ml/min、かくはん数 500 r.p.m.、30℃ の条件にて培養を行なう。その結果、最大ソルボース生成速度を維持する期間 (発酵盛期)、最大ソルボース生成速

度 0.0 r.p.m.、30℃ の条件で培養する。培養開始後 5~14 時間目にソルボース生成の最大速度 ($8.9 \times 10^{-5} \frac{\text{mol.sorbose}}{\text{ml.hr}}$) を示した。培養開始後約 15 時間で全発酵を完了した。この時ソルボースの生成量はソルビットに対して 95% であった。該発酵完了液を静置した後、下層に分離したフルオロカーボンを回収した。尚、フルオロカーボンを添加しなかった同条件の培養に於いて、ソルボースの最大生成速度は $5.8 \times 10^{-5} \frac{\text{mol.sorbose}}{\text{ml.hr}}$ で発酵完結には培養開始後 27 時間を要した。

実施例 2

実施例 1 と同組成の培地 100 ml を 500 ml 容坂口フラスコに調整し、フルオロカーボン (インナート・リキット FC-43) 20 ml を添加する。該液を常法に従って蒸気加圧滅菌し、30℃ に冷却した後、アセトバクター・サブオキシダンス ATCC-621 を接種する。140 c.p.m.、8.5 cm.stroke、30

にて培養を行なう。培養開始後10～28時間目にソルボース生成の最大速度 ($5.21 \times 10^{-5} \frac{\text{mol.sorbosc}}{\text{ml.hr}}$) を示した。培養開始後約30時間で全発酵を完了した。尚、フロオロカーボンを添加しなかった同条件の培養に於いて、ソルボース最大生成速度は $3.8 \times 10^{-5} \frac{\text{mol.sorbosc}}{\text{ml.hr}}$ で発酵完了には培養開始後40時間を要した。

実施例3

実施例1の方法に於いてフルオロカーボン(インナート・リキットFC-43)の代りにシリコンオイル(DC-200-1CS)100mlを用いて同様に培養する。培養開始後8～18時間目にソルボース生成の最大速度 ($7.45 \times 10^{-5} \frac{\text{mol.sorbosc}}{\text{ml.hr}}$) を示した。培養開始後約20時間で全発酵を完了した。

実施例4

グルコース20g、第2リン酸アンモニウム6g、L-アスパラギン2.5g、酵母エキス

実施例5

グリセロール20%、コーンスチープリカー1.5%、フマル酸アンモニウム0.5%、炭酸カルシウム1%の組成よりなる培地500mlを1l容発酵槽に調整し、フルオロカーボン(インナート・リキットFC-43)を添加する。該液を常法に従って蒸気加圧滅菌し、30℃に冷却した後、アセトバクター・サブオキシダンスATCC-621を接種する。通気量250ml/min、かくはん数500r.p.m.、30℃の条件で培養を行ない、ジヒドロキシアセトン(DHA)生成の結果は下記第3表の如くである。

第 3 表

FC-43添加量 (V/V%)	発酵盛期 (培養後hr)	DHA最大生成速度 ($\frac{\text{mol.DHA}}{\text{ml.hr}}$)	全発酵時間 (hr)
0	16～65	3.8×10^{-5}	72
20	15～60	5.2×10^{-5}	64
40	12～50	6.3×10^{-5}	56
60	10～45	7.2×10^{-5}	56

特開 昭48-96782(4)

5g、クエン酸・3ナトリウム塩1g、硫酸マグネシウム・7水和物0.25g、第1リン酸カリウム0.2g、硫酸亜鉛・7水和物2g、硫酸第1鉄1gを水1lに加え、pH5.0に調整する。該培地500mlを1l容発酵槽に分取し、フルオロカーボン(インナート・リキットFC-43)を添加する。該液を常法に従って蒸気加圧滅菌し、30℃に冷却した後、酵母サツカロミセス・セレビシアエ(*Saccharomyces cerevisiae*)を接種する。通気量250ml/min、かくはん数500r.p.m.、30℃の条件で培養を行ない、酵母の増殖率を観察した結果は下記第2表の如くである。

第 2 表

FC-43添加量 (V/V%)	培養盛期 (培養後hr)	培養盛期比増殖率 (1/hr)	全培養時間 (hr)
0	10～30	0.14	48
25	10～17	0.19	40
50	10～20	0.22	30

実施例6

デンプン3%、綿実粕4%、酵母エキス0.2%、食塩0.5%、炭酸カルシウム0.3%、硫酸銅・5水和物0.002%の組成からなる培地(PH無修正)100mlを121℃、20分間蒸気加圧滅菌した後、ストレプトミセス・フミダス・バー・エスピー(*Streptomyces humicus* var.sp) M C R L-0387株を1白金耳接種し、27℃、72時間振とう培養し種母液とする。

マルトラップ20%、綿実粕4%、食塩1%、炭酸カルシウム0.6%、硫酸銅・5水和物0.004%の組成からなる培地(PH無修正)100mlを500ml容三角コルベンに調整する。該培地にフルオロカーボン(インナート・リキットFC-43)を加えた後、121℃、20分間蒸気加圧滅菌する。冷却後前記種母液を3%となるように添加する。27℃、220c.p.m.の条件でしんとう培養する。抗生物質YA-56生成量の結果は下記第4

表の如くである。

尚、抗生物質 Y A - 5 6 の生産力価は、*Escherichia coli* N I H J 株を用い、シリンダー・プレート法によって測定した。

第 4 表

培養日数 FC-43 添加量(%)	14日		15日		18日	
	PH	力価(U/ml)	PH	力価(U/ml)	PH	力価(U/ml)
0	7.0	7.5	7.4	15.2	7.3	33.0
10	7.1	10.0	7.3	17.1	7.1	36.0
15	6.9	14.2	7.0	23.2	7.0	43.0
20	6.9	15.2	7.1	22.7	7.1	46.0

実施例 7

ポリペプトン 2.0 %、肉汁エキス 0.5 %、グルコース 1.0 %、炭酸カルシウム 1.0 %、食塩 0.5 % の組成からなる培地 (PH 無修正) 50 ml を滅菌後、ストレプトミセス・フラジアエ (*Streptomyces fradiae*) I S P - 5 0 6 3 株を 1 白金耳接種し、25℃、48 時間振とう培養し、これを種母液とする。

5. 添附書類の目録

- | | |
|-----------|-----|
| (1) 願書副本 | 1 通 |
| (2) 明細書 | 1 通 |
| (3) 委性状 | 1 通 |
| (4) 審査請求書 | 1 通 |

6. 前記以外の発明者

大阪府豊中市上野坂 1-19-3

山田 茂樹

奈良県奈良市登美丘一丁目(無番地)

和田 満

奈良県大和高田市片塩 17-9

泉尾 信彦

埼玉県与野市大字鈴谷字小井戸 254 の 1

山口 東太郎

特開 昭 48-96782 (5)

上記と同一組成の培地 50 ml を 250 ml 容コルベんに調整し、フルオロカーボン (インナート・リキット PC-43) を添加する。

121℃、20 分間蒸気加圧滅菌し、冷却後前記の種母液 1 ml を添加する。25℃、150 o.p.m. の条件でしんとう培養する。

ネオマイシン生成量の結果は下記第 5 表の如くである。

尚、抗生物質ネオマイシンの生産力価は、*Staphylococcus aureus* Terashima を用い、シリンダー・プレート法によって測定した。

第 5 表

培養日数 FC-43 添加量(%)	2日		3日		5日	
	PH	力価($\frac{mg}{ml}$)	PH	力価($\frac{mg}{ml}$)	PH	力価($\frac{mg}{ml}$)
0	8.2	852	8.7	1150	9.0	1142
20	8.6	1413	8.8	1650	9.1	1510

代理人 弁理士 中 嶋 正 二

自発手続補正書

昭和 47 年 5 月 22 日

特 許 庁 長 官 殿

1. 事件の表示

昭和 47 年 特 許 願 第 29302 号

2. 発明の名称

好気微生物の培養法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

大阪府大阪市東区道修町 3 丁目 21 番地 (〒541)

(295) 田辺製薬株式会社

代表者 平 林 忠 雄

4. 代 理 人

大阪府大阪市東淀川区加島町 962 番地 (〒532)

田辺製薬株式会社内

(6461) 弁理士 中 嶋 正 二

5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

6. 補正の内容

別紙の通り

補 正 の 内 容

1. 明細書第4頁3行目の
「イソナート・リキット」を
「インナート・リキット」に訂正する。
2. 同第5頁2行目の
「100 ml / 100 ml 以下」を
「100 ml / 100 ml 以上」に訂正する。
3. 同第6頁8行目の
「大豆油、」を削除する。
4. 同第6頁11行目の
「酢酸フマル酸」を
「酢酸、フマル酸」に訂正する。
5. 同第6頁下から4行目の
「微量成分」の次に
「または界面活性剤」を挿入する。
6. 同第8頁下から2行目の
「維持」を
「維持」に訂正する。
7. 同第9頁下から7行目の

- 「1. 内容欄」を
「1. 内容欄」に訂正する。
8. 同第13頁12～13行目の
「下許第3表」を
「下記第3表」に訂正する。

代理人 弁理士 中 嶋 正 二

自 発 手 続 補 正 書

昭和48年2月24日

特 許 庁 長 官 殿

1. 事件の表示
昭和47年特許願第 29302 号
2. 発明の名称
好気微生物の培養法
3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人
大阪府大阪市東区道修町3丁目21番地 (〒541)
(295) 田 辺 製 薬 株 式 会 社
代 表 者 平 林 忠 雄
4. 代 理 人
大阪府大阪市東淀川区加島町962番地 (〒532)
田 辺 製 薬 株 式 会 社 内
(6461) 弁理士 中 嶋 正 二
5. 補正の対象
明細書の発明の詳細な説明の欄
6. 補正の内容
別紙の通り

補 正 の 内 容

1. 明細書第4頁7行目の
「化学式 $C_{12}H_{27}N$ 」を
「化学式 $C_{12}H_{25}N$ 」に訂正する。

代理人 弁理士 中 嶋 正 二